






Process for preparing membrane proteins from Neisseria meningitidis and vaccines containing them.

Publication number: EP0011243 (A1)	Also published as:
Publication date: 1980-05-28	 EP0011243 (B1)
Inventor(s): HELTING TORSTEN BERTIL DR; GUTHOHRLEIN GERHARD DR +	 JP55066519 (A)
Applicant(s): BEHRINGWERKE AG [DE] +	 IL58673 (A)
Classification:	 ES485715 (A1)
- international: A61K38/16; A61K39/095; A61K38/16; A61K39/095; (IPC1-7): A61K39/095; C12P21/00	 DK154841 (B)
- European: A61K39/095	more >>
Application number: EP19790104391 19791108	
Priority number(s): DE19782848965 19781111	

Abstract of **EP 0011243 (A1)**

1. Process for the isolation of membrane proteins from Neisseria meningitidis which comprises treating the organism with the aqueous solution of a detergent in a concentration of 0.1 to 2% w/v for 15 minutes to 24 hours, allowing the mixture to stand, optionally with agitation, separating the extract from the bacterial residue and optionally carrying out a further purification.

.....
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

12 **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: **79104391.2**

51 Int. Cl.³: **C 12 P 21/00**
A 61 K 39/095

22 Anmeldetag: **08.11.79**

30 Priorität: **11.11.78 DE 2848965**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
28.05.80 Patentblatt 80/11

84 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT NL SE

71 Anmelder: **BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT**
Postfach 1140
D-3550 Marburg/Lahn(DE)

72 Erfinder: **Helting, Torsten Bertil, Dr.**
Oberer Eichweg 24
D-3550 Marburg/Lahn(DE)

72 Erfinder: **Guthöhrlein, Gerhard, Dr.**
Am Ziegenberg 8
D-3550 Marburg/Lahn(DE)

74 Vertreter: **Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr. et al,**
HOECHST Aktiengesellschaft Zentrale Patentabteilung
Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt/Main 80(DE)

54 **Verfahren zur Herstellung von Membranproteinen aus Neisseria meningitidis und diese enthaltende Vaccine.**

57 Es wird ein Verfahren zur Gewinnung von Membranproteinen aus Neisseria meningitidis durch Behandlung mit einem Detergenz sowie eine diese Membranproteine enthaltende Vaccine beschrieben.

EP 0 011 243 A1

-1-

BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT HOE 78/B 018 Dr.HA/Pa

Verfahren zur Herstellung von Membranproteinen aus
Neisseria meningitidis und diese enthaltende Vaccine

Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von Membranproteinen aus Neisseria meningitidis sowie eine diese Membranproteine enthaltende Vaccine.

- 5 Der Erreger der Meningitis cerebrospinalis epidemica ist die Neisseria meningitidis, auch Meningokokkus genannt. Die durch Tröpfcheninfektion übertragbare Genickstarre oder Hirnhautentzündung tritt vor allem bei Kindern und Personen in Massenquartieren auf. Es besteht deshalb ein
- 10 Bedürfnis, gefährdete Personengruppen zu immunisieren.

Nach vorliegenden Erkenntnissen ist das wichtigste Membranprotein (Major outer Membrane protein) der Neisseria meningitidis in der Lage, bakterizide Antikörper zu induzieren.

- 15 Diese bieten einen serologisch typenspezifischen Schutz gegen die Erkrankung. Andere Komponenten der Neisserien, insbesondere die Kapselpolysaccharide der Neisserien Gruppe A und C können einen gruppenspezifischen Schutz bewerkstelligen. Sie induzieren jedoch nicht einen wirk-
- 20 samen Schutz gegen Neisserien der Gruppe B. Auch fehlen Hinweise dafür, daß das Kapselpolysaccharid der Gruppe B einen solchen Schutz induzieren kann. Deshalb sind die Membranproteine der Neisseria meningitidis Gruppe B von besonderem Interesse.

Für die Herstellung einer Vaccine ist es erforderlich, Membranprotein aus Neisseria meningitidis Gruppe B in ausreichender Menge zu gewinnen. Das von Frasch in Bact. 127, 973 - 981 (1976) beschriebene Verfahren führt zu einem brauchbaren Präparat. Die Ausbeute nach diesem Verfahren liegt jedoch an der unteren, wirtschaftlich vertretbaren Grenze. Das Wesen des Verfahrens nach Frasch besteht darin, daß Keime der Neisseria meningitidis mit Salzlösungen (CaCl_2 -oder LiCl -Lösungen) zunächst gewaschen und der Extrakt anschließend mit Desoxycholat behandelt wird. Wie bereits erwähnt, führt dieses Verfahren jedoch zu einer schlechten Ausbeute.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß die Ausbeute wesentlich erhöht werden kann, wenn die Keimmasse einer direkten Behandlung mit Detergenzien unterzogen wird. Das erfindungsgemäß gewonnene Material unterscheidet sich nicht erkennbar von Membranproteinpräparaten nach Frasch. Es besitzt die gleichen elektrophoretischen Eigenschaften in SDS-haltigen Pufferlösungen. Sein Endotoxingehalt ist mit dem nach Frasch erhaltenen Material ebenso vergleichbar wie seine Fähigkeit, schützende Antikörper in Tieren zu induzieren.

Gegenstand der Erfindung ist demnach ein Verfahren zur Herstellung von Membranprotein aus Neisseria meningitidis, insbesondere solcher der Gruppe B, dadurch gekennzeichnet, daß man diese mit der wäßrigen Lösung eines Detergenz in einer Konzentration von 0,1 % bis 2 % für 15 Minuten bis 24 Stunden, ggf. unter Bewegung, stehen läßt, den Extrakt vom Bakterienrückstand abtrennt und gegebenenfalls weiter reinigt.

Als Detergenz wird bevorzugt Desoxycholat, insbesondere in seiner relativ leicht wasserlöslichen Form des Natriumsalzes verwendet. Die Konzentration des Detergenz von 0,1 bis 2 % bezieht sich auf das Gewicht des Detergenz in Gramm pro Volumen in ml. Das Verhältnis von feuchter

Bakterienmasse zur Detergenzienlösung liegt vorteilhaft bei 1:3 - 1:20, vorzugsweise 1:5 (w/v).

5 Sofern als Detergenz Natriumdesoxycholat verwendet wird, wird dieses in einer Konzentration von 0,3 % bis 1 % in einer wäßrigen Lösung verwendet. Als wäßrige Lösungen kommen vor allem die in der biochemischen oder mikrobiologischen Praxis üblichen Pufferlösungen in Frage.

0 Als Ausgangsmaterial wird die nach bekannten Verfahren erhältliche Kultur der *Neisseria meningitidis* gewonnen und die Zellmasse vom Nährbodenüberstand abgetrennt. Vorteilhaft ist hierfür die Zentrifugation. Der Zentrifugenrückstand wird in der detergenzhaltigen Lösung
5 suspendiert und erfindungsgemäß eine Zeitlang stehen gelassen. Danach wird der Extrakt von dem Zellrückstand abgetrennt. Vorteilhaft ist hier ebenfalls die Durchführung einer Zentrifugation.

10 Die Temperatur, bei der die Extraktion ausgeführt wird, wird nach unten durch den Gefrierpunkt der verwendeten Lösungen begrenzt. Die obere Grenze ergibt sich durch den Verlust der Immunogenität der Membranproteine durch Hitzedenaturierung. Daher empfiehlt es sich, im Temperaturbereich zwischen Raumtemperatur und etwa 60°C zu
15 arbeiten.

Der Extrakt kann gewünschtenfalls weiter gereinigt werden. Es ist zweckmäßig, hierzu zunächst den bei Ultrazentrifugation gewinnbaren Rückstand einer nochmaligen Extraktion mit der detergenzhaltigen Lösung zu unterwerfen
0 und diese Extraktion gewünschtenfalls nochmals zu wiederholen. Dabei wird jeweils der Ultrazentrifugationsüberstand verworfen und der Rückstand in der detergenzhaltigen wäßrigen Lösung suspendiert.

Eine Anreicherung bzw. Reinigung ist auch mit in der Biochemie üblichen Fällungsmitteln für Proteine und entsprechende Antigene möglich. So kann das Neisseria meningitidis-Antigen durch Zusatz von beispielsweise
5 4 Volumenteilen Äthanol gefällt und die Fällung in wässriger Lösung wiederaufgenommen werden.

Das steril filtrierte und evtl. gefriergetrocknete Neisseria meningitidis-Antigen ist geeignet, schützende
10 Antikörper gegen den Erreger zu induzieren.

Dieses Antigen kann mit Adjuvantien, stabilisierenden Zusätzen, Füllstoffen und ähnlichen Substanzen, wie sie bei der Vaccineherstellung üblicherweise Anwendung finden,
15 versetzt werden.

Die Membranproteine entfalten eine immunogene Wirkung. Eine die erfindungsgemäß herstellbaren Membranproteine in einer immunisatorisch wirksamen Menge enthaltende Vacci-
20 ne stellt im besonderen den Gegenstand der Erfindung dar. Die Vaccine kann in einer Dosierung von etwa 10 - 200 µg pro Dosis verabreicht werden.

Die Erfindung soll an nachstehenden Beispielen näher er-
25 läuert werden:

300 g Keimmasse (Naßgewicht) von *Neisseria meningitidis* Gruppe B, Stamm 986, wurden in 1500 ml Natriumdesoxy-
5 cholatlösung (0,5 % Natriumdesoxycholatlösung in 0,01 M Tris-HCl, pH 8.5, 0,01 M EDTA), die vorher auf 60°C gebracht worden war, resuspendiert und 15 Minuten in einem Wasserbad (56°C) gehalten. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation zur Abtrennung der Keimmasse (Sorvall GSA Rotor,
10 10 000 U/Min.). Der Rückstand wurde anschließend wie oben nochmals mit Natriumdesoxycholatlösung 15 Min. behandelt und der zweite Überstand nach erneuter Zentrifugation mit dem ersten Überstand vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden dann in einer Beckman L 75 Zentrifuge bei
15 40 000 U/Min. in einem 45 Ti Rotor 60 Min. geschleudert. Das Sediment wurde in 150 ml Natriumdesoxycholatlösung suspendiert und über Nacht bei 4°C gerührt.

Zur Weiterreinigung wurde die Suspension am nächsten Tag
20 in einem Wasserbad (56°C, 15 Min.) erhitzt, erneut in der Ultrazentrifuge wie oben (Rotor 45 Ti 40 000 U/Min, 60 Min.) geschleudert und das Sediment in 150 ml Natriumdesoxycholatlösung resuspendiert. Zur Resuspension wurde ein Ultrasonic Cleaner der Firma Laboratory Supplies Co.,
25 Inc, Hicksville N.Y., USA, verwendet. Aliquote à 50 ml wurden jeweils 3 Minuten beschallt und anschließend vereinigt. Partikuläres Material wurde durch eine abermalige Zentrifugation (Sorvall, SS-34 Rotor 20 000 U/Min., 20 Min.) abgetrennt und der Überstand filtriert. Das Membranprotein
30 wurde anschließend durch Zusatz von 600 ml 96 %igem Äthanol steril ausgefällt und 60 Min. stehengelassen. Die Fällung wurde durch Zentrifugation (Sorvall, GSA Rotor) gewonnen, einmal mit 100 ml Äthanol gewaschen und anschließend in 150 ml 5 %iger Raffinose steril aufgenommen
35 und über Nacht bei 4°C gerührt.

Die optische Dichte (O.D.) des Materials (280 nm) wurde bestimmt und durch Zusatz von 5 %iger Raffinose auf

O.D.₂₈₀=1.2 eingestellt. Dieses Konzentrat wurde dann in üblicher Weise zu einer Vaccine verarbeitet.

- Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde ein aliquoter Teil unter sterilen Bedingungen entnommen, mit 1 Vol. Trichlor-
5 essigsäure (TCA) (10 %ig) gefällt, die Fällung in 5 %iger TCA gewaschen und in 1 M KOH aufgenommen.

Beispiel 2

- 10 50 g Keimmasse wurde wie in Beispiel 1 aufgearbeitet, aber statt 0,5 % Natriumdesoxycholat wurde eine Lösung mit 0,1 % Natriumdexoxycholat verwendet. Die Ausbeute betrug 0,8 mg/g Zellmasse, während die Ausbeute nach Ausführungsbeispiel 1 2.3 mg/g betrug.

15

Beispiel 3

- 50 g Keimmasse wurde wie in Beispiel 1 aufgearbeitet, aber statt 0,5 % Natriumdesoxycholat wurde eine Lösung
20 mit 2,0 % Natriumdesoxycholat verwendet. Die Ausbeute betrug 2.2 mg/g Zellmasse, während die Ausbeute nach Ausführungsbeispiel 1 2.3 mg/g betrug.

Beispiel 4

25

- 50 g Keimmasse wurde wie in Beispiel 1 aufgearbeitet, aber statt 0,5 % Natriumdesoxycholat in 0,01 M Tris-HCl-
0.001 M EDTA wurde 0,5 % Natriumdesoxycholat in a) 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7.8, b) Hepes Puffer (0,1 M, pH 7.8)
30 oder c) 0.1 M Natriumcarbonatpuffer, pH 8.5, verwendet. Die Ausbeuten variieren zwischen 1.8 mg/g und 2.5 mg/g.

Beispiel 5

- 35 Entsprechend Beispiel 1 wurde die Extraktion mit weiteren Detergenzien ausgeführt. Die Ausbeuten zeigt folgende Tabelle:

<u>Detergenz Konzentration Ausbeute (mg/g Naßgewicht)</u>		
Harnstoff	4 M	1.2
Emulphogen 1 % (GAF Corp.)	1 %	1.3
5 Tween 20	1 %	2.6
Triton x 100	1 %	2,7

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Membranproteinen aus
Neisseria meningitidis dadurch gekennzeichnet, daß man
diese mit der wässrigen Lösung eines Detergenz in einer
Konzentration von 0,1 bis 2% w/v für 15 Minuten bis
5 24 Stunden, gegebenenfalls unter Bewegung, stehenläßt,
den Extrakt vom Bakterienrückstand abtrennt und ggf.
weiter reinigt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
10 daß als Neisseria meningitidis ein Stamm der Gruppe B
verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß als Detergenz Desoxycholat verwendet wird.
15
4. Vaccine gegen Meningitis cerebrospinalis epidemica,
gekennzeichnet durch den Gehalt einer wirksamen immuni-
sierenden Menge eines nach dem Verfahren der Ansprüche 1,
20 2 oder 3 erhältlichen Membranproteins.



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl. ³)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
	<p>THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, Band 147, 1978, Nr. 3, C.E. FRASCH et al.: "Protection against group B meningococcal disease III. Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a guinea pig model", Seiten 629-644</p> <p>* Seiten 630,642 *</p> <p>--</p> <p>CHEMICAL ABSTRACTS, Band 89, Nr. 15, 9. Oktober 1978, Zusammenfassung Nr. 127600p. Seite 441, Columbus, Ohio, US, W.D. ZOLLINGER et al.: "Safety and immunogenicity of Neisseria meningitidis type 2 protein vaccine in animals and humans" & J.Infect.Dis. 1978, 137(6), 728-39</p> <p>* Zusammenfassung *</p> <p>--</p> <p>CHEMICAL ABSTRACTS, Band 64, Nr. 13, 20. Juni 1966, Zusammenfassung Nr. 20236e, Columbus, Ohio, US, N.A. VEDROS et al.: "Chemical and antigenic analysis of the cell walls of Neisseria meningitidis group B" & J.Bacteriol. 91(5), 1992-7. 1966</p> <p>* Zusammenfassung *</p> <p>----</p>	<p>1-4</p> <p>1-4</p> <p>1-4</p>	<p>C 12 P 21/00 A 61 K 39/095</p> <p>RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. ³)</p> <p>A 61 K 39/00</p> <p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X: von besonderer Bedeutung A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: kollidierende Anmeldung D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>
<input checked="" type="checkbox"/>	Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.		
Recherchenort	Abchlußdatum der Recherche	Prüfer	
Den Haag	26-02-1980	RYCKEBOSCH	